

10.08.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 27 SEP 1999

WIPO

PCT

JP 99/04332

EJUV

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 3月26日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第084583号

出 願 人

Applicant(s):

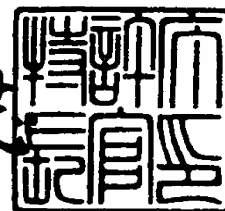
明治乳業株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 8月27日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3059917

【書類名】 特許願

【整理番号】 P99003

【提出日】 平成11年 3月26日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所内

【氏名】 村杉 章

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所内

【氏名】 浅見 幸夫

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社細胞工学センター内

【氏名】 城戸 勲

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社細胞工学センター内

【氏名】 熊井 英志

【特許出願人】

【識別番号】 000006138

【氏名又は名称】 明治乳業株式会社

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第236621号

【出願日】 平成10年 8月10日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 059101

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 真正MKファミリータンパク質の大量分泌発現系

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (a)ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 由来のメタノール誘導性のアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1)プロモーター配列、(b)サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の $\alpha 1$ 因子のシグナル配列、(c)MKファミリータンパク質をコードする遺伝子、(d)ピキア・パストリス由来のメタノール誘導性のアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1)の転写終結配列、(e)大腸菌及びメチロトロフィック酵母 (methylophilic yeast)で機能する選択マーカ遺伝子、(f)大腸菌で機能する複製開始点、及び(g)メチロトロフィック酵母染色体DNAへの部位特異的相同組換えのための5' AOX1及び3' AOX1、からなるMKファミリータンパク質発現ベクターによって形質転換されたメチロトロフィック酵母による真正MKファミリータンパク質の分泌発現系。

【請求項 2】 メチロトロフィック酵母がピキア・パストリスである請求項 1 に記載の分泌発現系。

【請求項 3】 MKファミリータンパク質がMKタンパク質である請求項 1 または 2 に記載の分泌発現系。

【請求項 4】 MKファミリータンパク質がPTNタンパク質である請求項 1 または 2 に記載の分泌発現系。

【請求項 5】 形質転換されたメチロトロフィック酵母がpPIC9DP-hMK/SMD116 8である請求項 3 に記載の分泌発現系。

【請求項 6】 形質転換されたメチロトロフィック酵母がpPIC9-hPTN/GS115である請求項 4 に記載の分泌発現系。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、メチロトロフィック酵母を宿主とした、組換えDNA技術による、真正MKファミリータンパク質の大量分泌発現系に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

MKは、胚性腫瘍細胞のレチノイン酸による分化誘導の初期段階で一過性に発現する遺伝子の産物として、1988年に門松らによりcDNAがクローニングされた（K-adomatsu, K. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 151 : 1312-1318）。MKは、塩基性アミノ酸とシステインに富む分子量13kDaのヘパリン結合性の分泌性のタンパク質である（Tomomura, M. et al. : J. Biol. Chem., 265 : 10765-10770, 1990）。MK cCDNクローニングから2年後、MKと高いホモロジーをもつプレイオトロフィン（Pleiotrophin : PTN）のcDNAがクローニングされた（Li, Y.-S. et al. : Science, 250 : 1690-1694; Merennies, J. & Rauvala, H. : J. Biol. Chem., 16721-16924, 1990）。PTNタンパク質は、分子量18kDaヘパリン結合性の分泌性のタンパク質であり、MKタンパク質とは約50%のホモロジーを有する。MKおよびPTNは、その一次構造から、明らかに他のヘパリン結合性増殖因子とは区別され、この2つのみをメンバーとするMKファミリーを形成する（Muramatsu, T. : Int. J. Dev. Biol., 37 : 183-188, 1993; Muramatsu, T. : Dev. Growth Differ., 36 : 1-8, 1994）。

【0003】

MKおよびPTNタンパク質は、胎児（仔）の神経細胞の突起伸長能を始めとして、多岐にわたる生物活性を示し、また、多くのヒト癌でのMKタンパク質の発現の増強、あるいは梗塞巣周辺のMKタンパク質の一過性の発現の増強、などさまざまな疾病と関連している（村松喬：蛋白質 核酸 酵素, 43 : 2288-2294, 1998 ; 門松健治 : 生化学, 70 : 1315-1325, 1998）。

【0004】

このようなMKファミリータンパク質の多岐にわたる生物活性や疾病との関連を生かした医薬品の開発の計画がなされている。例えば、PTNタンパクによる損傷神経細胞の修復または処理（特開平6-253850）、抗MKタンパク抗体による癌の診断・治療薬（特開平6-172218）、あるいは虚血性脳疾患の予防・治療剤（国際出願番号：PCT/JP98/04299）などの特許出願がなされている。

【0005】

このように、MKファミリーのタンパク質は、医薬品として、その有用性が期

待されるので、これらのタンパク質を大量に発現する系の開発が望まれている。特に、天然由来のMKタンパク質（以下、「真正MKタンパク質」と称する）、およびPTNタンパク質（以下、「真正PTNタンパク質」と称する）は、糖が付加されていないので、これらのタンパク質を組換えDNA技術で大量発現できれば、医薬品への応用だけでなく、構造・機能解析への利用など、その有用性は極めて大きいと考えられる。

【0006】

MKファミリータンパク質の発現系として、メタノール資化性酵母（以下、「メチロトロフィック酵母」と称する）は、好適と考えられる。一般に、酵母は、単細胞真核生物であり、分子生物学的知見が豊富であることや、安全性、培養の容易な点などから、組換えDNA技術により、有用なタンパク質を生産する際の宿主として利用されている。特に、酵母の分泌発現系は、発現されたタンパク質が細胞外に放出されるため、連続培養が可能で大幅なタンパク質の生産量の増加が期待でき、さらに、細胞を破碎する手間がいらないので、精製はかなり容易となる。

【0007】

そこで、本発明者らは、メチロトロフィック酵母であるピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）を宿主としたMKタンパク質の大量分泌発現系の確立を試みてきた。ピキア・パストリスによる異種遺伝子発現系が開発され、該発現系によるB型肝炎ワクチンの生産やインベルターゼの高分泌発現が報告されている（Cregg, J. M. et al. : Bio/Technology, 11 : 905-910, 1993）。しかしながら、MKタンパク質の場合、その発現量は少なく（30～50mg/L）、そのうえ、発現MKタンパク質の大部分は、動物細胞で付加される糖とは異なる酵母由来の糖を結合している。すなわち、真正MKタンパク質の含有量は極めて少ない。酵母由来の糖を有するMKタンパクを医薬品として用いた場合、抗原性の問題が生じる。そこで、発現産物から真正MKタンパク質の分離・精製が必要となるが、糖の有無にかかわらず、タンパク質は同一なので、分離・精製は極めて困難である。

【0008】

本発明者らは、真正MKタンパク質の発現量の増加を目指して、発現カセット

のコピー数を増加させた発現株をいろいろ作製して発現を試みたが、MKタンパク質の場合、コピー数はあまり関係ないようで、ファーメンターでの発現量が従来株の約2倍程度の細胞株は得られたものの、真正MKタンパク質の大幅な発現の増加が見られる株は得られなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明は、メチロトロフィック酵母を宿主とした真正MKファミリータンパク質の大量分泌発現系の確立を課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、メチロトロフィック酵母のアルコールオキシダーゼのプロモーター支配下に、成熟MKファミリータンパク質をコードするcDNAを、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の $\alpha 1$ 因子遺伝子のシグナル配列の直後に結合させたMKファミリータンパク質発現ベクターを構築し、これを用いてメチロトロフィック酵母を形質転換させたところ、得られた形質転換体が、培地中に、活性型の真正MKファミリータンパク質を大量に分泌発現することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、メチロトロフィック酵母を宿主とした、組換えDNA技術による、MKファミリータンパク質の大量分泌発現系に関し、より具体的には、

(1) (a)ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 由来のメタノール誘導性のアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1) プロモーター配列、(b)サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の $\alpha 1$ 因子のシグナル配列、(c)MKファミリータンパク質をコードする遺伝子、(d)ピキア・パストリス由来のメタノール誘導性のアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1) の転写終結配列、(e)大腸菌及びメチロトロフィック酵母 (*methylotrophic yeast*) で機能する選択マーカー遺伝子、(f)大腸菌で機能する複製開始点、及び(g)メチロトロフィック酵母染色体DNAへの部位特異的相同組換えのための5' AOX1及び3' AOX1、からなるMKフ

ファミリータンパク質発現ベクターによって形質転換されたメチロトロフィック酵母による真正MKファミリータンパク質の分泌発現系、

(2) メチロトロフィック酵母がピキア・パストリスである(1)に記載の分泌発現系、

(3) MKファミリータンパク質がMKタンパク質である(1)または(2)に記載の分泌発現系、

(4) MKファミリータンパク質がPTNタンパク質である(1)または(2)に記載の分泌発現系、

(5) 形質転換されたメチロトロフィック酵母がpPIC9DP-hMK/SMD1168である(3)に記載の分泌発現系、

(6) 形質転換されたメチロトロフィック酵母がpPIC9-hPTN/GS115である(4)に記載の分泌発現系、

に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】

一般に、分泌タンパク質は、そのN末端側にシグナル配列(プレ配列)と呼ばれる20~30アミノ酸からなる配列を有する前駆体として合成されるが、このシグナル配列とは別に、プロテアーゼなどの加水分解酵素、ホルモン、増殖因子などの多くは、成熟部分に隣接したプロ配列と呼ばれる余剰部分をもつ。このプロ配列の機能については、成熟タンパク部分のジスルフィド結合の正しい形成に必須であること(Weissman, J. S. & Kim, P. S.: Cell, 71: 841-851, 1992)、成熟タンパク部分の膜透過に関与すること(Wiren, K. M. et al.: J. Biol. Chem., 263: 19771-19777, 1988)、あるいはプロ配列が成熟タンパク部分と相互作用し、活性のある正しい高次構造の形成を促進する機能をも有していること(Winter, J. L. & Sorensen, P.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88: 9330-9334, 1991)、など、いくつかのプロ配列の機能の解析例が報告されているが、まだ不明な点も多い。また、シグナル配列を他のシグナル配列に置換すると、シグナルペプチドの除去や、糖鎖付加の効率が著しく減少するとの報告もある(Cramer, J. H. et al.: Mol. Cell. Biol., 7: 121, 1987)。本発明においては、この

プレプロ配列を含めて「シグナル配列」という。

【0012】

酵母の分泌タンパク質の中で、遺伝子の構造が明らかにされているものは、インベルターゼ (SUC2)、酸性ホスファターゼ (PHO5、PHO3)、 α -ガラクトシダーゼ (MEL1)、 α 因子 (MF α 1、MF α 2)、a因子 (MFa1、MFa2)、二重鎖RNAキラー毒素 (KILM1)、線状DNAプラスミドのキラー毒素 (KIL97、KIL28) などの遺伝子である。MF α 1、MF α 2、KILM1、KIL97は、プレプロ構造を有している。異種タンパク質の分泌生産に最もよく利用されているMF α 1のシグナル配列は、85~89アミノ酸残基からなる (J. Kurjian & I. Herskowitz: Cell, 36: 933, 1982)。

【0013】

異種タンパク質の分泌生産を飛躍的に高めるために、基本的には、分泌シグナルの直後に、タンパク質領域をコードするcDNA、またはイントロンを含まない遺伝子を、酵母で機能するプロモーターとターミネーターの間に挿入した発現ベクターが用いられる。分泌シグナルには、酵母固有の分泌タンパク質遺伝子のもつシグナルか、酵母以外の分泌シグナルが用いられる。

本発明の、MKファミリーのタンパク質の分泌生産に使用する発現ベクターは文献 (J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989) に記載の標準的な方法で構築できる。発現ベクターは、適切なメチロトロフィック酵母の発現ベクターを使用する。本発明の実施に好適なベクターとは、ピキア属および最も好適には、ピキア・パストリス GS115 (寄託番号; NRRL Y-15851) に適合するベクターである。最も好適な発現ベクターとして、例えば、図5に示す発現ベクターpPIC9 (Phillips Petroleum Co.,) を用いることができる。該ベクターは、大腸菌およびピキア・パストリスのそれぞれでの選択に必要な遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子 (Ampicillin) およびピキア酵母ヒスチジノール脱水素酵素遺伝子 (HIS4)、をもつシャトルベクターである。この発現ベクターは、大腸菌プラスミドpBR322由来の複製開始点 (ColE1)、異種遺伝子を発現させるためのピキア酵母アルコールオキシダーゼの

プロモーター (5' AOX1) , サッカロミセス・セレビスエの α 1 因子分泌シグナルをコードする DNA (S) 、AOX1 遺伝子の転写終結配列 (3' AOX1-TT) 、および 5' AOX1 と共にピキア・パストリス染色体 DNA への部位特異的挿入に関与する 3' AOX1 を含んでいる。

【0014】

α 1 因子シグナル配列を利用する場合、異種遺伝子の挿入部位は、(1) 85 番目の Lys の後と、(2) 89 番目の Ala の後の 2 例が報告されている (菱沼文夫: 化学と生物, 26: 568~576, 1988) 。本発明では、MK ファミリータンパク質固有のシグナル配列に換えて、図 3 に示す、サッカロミセス・セレビスエの α 1 因子シグナル配列を利用するのを特徴としている。MK 遺伝子の場合、 α 1 因子のプレプロ配列の最後の Lys-Arg に続くスペーサー配列 Glu-Ala-Glu-Ala の直後 (すなわち、上記 (2) の例) に、あるいはその後に位置する EcoRI 部位に、PTN 遺伝子の場合、最後の Lys-Arg の直後に挿入するのが好ましい。

MK ファミリータンパク質の構造遺伝子は、すでに公知である。すなわち、ヒト MK 遺伝子は、Met (1-3 の ATG) から、Ala (64-66 の GCC) に至る 22 個のアミノ酸からなるシグナルペプチドと、それに続く Lys (67-69 の AAA) から Asp (427-429 の GAC) に至る 121 個のアミノ酸からなる成熟タンパク質をコードしている (配列番号: 1 の核酸配列、および配列番号: 2 のアミノ酸配列参照) 。また、PTN タンパク質の遺伝子は、Met (1-3 の ATG) から、Ala (94-96 の GCA) に至る 32 個のアミノ酸からなるシグナルペプチドと、それに続く Gly (97-69 の AAA) から Asp (502-504 の GAT) に至る 136 個のアミノ酸からなる成熟タンパク質をコードしている (配列番号: 6 の核酸配列、および配列番号: 7 のアミノ酸配列参照) 。本発明は、ここに例示した MK ファミリータンパク質の遺伝子配列の使用に限定されない。当業者であれば、MK あるいは PTN タンパク質の生物学的機能を損なうことなく、これらの遺伝子配列の限定改変を行うことが可能である。生物学的機能の類似した、MK あるいは、PTN 遺伝子の修飾、例えば、欠失、挿入または置換などの修正も本発明に含まれる。

【0015】

MK ファミリーのタンパク質をコードする遺伝子は、該遺伝子の増幅に適切な

センスPCRプライマーおよびアンチセンスPCRプライマー（MK遺伝子の場合は配列番号：3、4、あるいは5、PTN遺伝子の場合は配列番号：8、および9）を用い、該遺伝子を鋳型としてPCRを行い、遺伝子を増幅する。この場合、プライマーには、発現ベクターに含まれる適切な制限酵素認識部位を含ませる。次いで、該遺伝子を発現ベクターの適切な制限酵素切断部位に挿入する。MKファミリーの成熟タンパク質遺伝子を含む発現ベクターで大腸菌HB101、あるいはXL1-Blue MRF'を形質転換する。形質転換した大腸菌クローンをいくつか選び、これに含まれる発現ベクターを鋳型とし、適当なプライマーを使用してPCRを行い、挿入遺伝子の向きが正しいことを確認する。この発現ベクターについて、MK遺伝子および挿入部位付近の塩基配列を決定し、塩基配列に誤りのないことを確認する。

【0016】

形質転換のための酵母宿主は、適切なメチロトロフィック酵母すべてを含む。メチロトロフィック酵母は、ハンセヌラ（*Hansenula*）、カンジダ（*Candida*）、クロエケラ（*Kloeckera*）、ピキア、サッカロミセス、およびロドトルラ（*Rhodotul*a）からなる属から選択される、メタノール存在下で増殖可能な酵母を含む。好適には、栄養要求性ピキア・パストリスGS115（NRRL Y-15851）などのピキア属のメチロトロフィック酵母である。プロテアーゼ活性の低下しているメチロトロフィック酵母、例えば、SMD1168（Phillips Petroleum Company）も好適に使用できる。MKファミリータンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターを導入するための形質転換法は、プロトプラスト法（Hinen, A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1929, 1978）、リチウム法（Ito, H. et al.: J. Bacteriol., 153: 163, 1983）、電気パルス法（D.M. Becker, L. Guarente, "Method in Enzymology", ed. by C. Guthrie, G. Fink, Vol. 194, p. 182, Academic Press, New York, 1991）などのうち、何れの方法でも実施可能であるが、例えば、電気パルス法を用いる場合は、Invitrogenのプロトコール（例えば、pPICZA α , B, C, Version A, 160410, 25-0150）を用いることができる。

【0017】

形質転換されたメチロトロフィック酵母は、栄養要求性酵母を形質転換後（酵

母の栄養要求性に従って) 栄養素を含まない培地による選択と、新しい表現型 (“メタノール利用能+/-, Mut+/-”) を検出することによる単離、または、形質転換体に耐性遺伝子を含む場合は、酵母に対して毒性を有する抗生物質の存在下で培養することにより単離できるが、これらに限定されない。

単離した形質転換メチロトロフィック酵母は、フラスコ振とう培養法、高密度培養法のような適切な培養技術によって培養される。MKファミリータンパク質の発現は、ベクターに含まれるメタノール応答性の発現調節領域 (例えば、アルコール オキシダーゼのプロモーター) に適合した方法により達成できる。すなわち、発現の誘導は、メタノールの存在下形質転換酵母を培養することにより可能である (特開平7-111891および特開平8-228779参照)。ヒトMKタンパク質のシグナル配列を使用した発現株 (pHILD4-hMK/GS115) と $\alpha 1$ 因子のシグナル配列を含む発現株 (pPIC9K-4AhMK/GS115) のファーメンター培養におけるMKタンパク質の発現量をELISA法で比較すると、図6に示すように、ヒトMKタンパク質のシグナル配列を含む発現株の場合、培養4日目で、発現量が30-50mg/L ($1.8A_{280}=1\text{mg/ml}$ として計算) であるのに対して、 $\alpha 1$ 因子を含む発現株の場合には、約200mg/Lであり、さらに、培地にEDTAを加えると、約240mg/Lの発現量が得られている。一方、同じサンプルをFPLC分析にて測定すると、図7に示すように、EDTAを加えた場合の発現量は約640mg/L (この内約1/3がN末端に4個のアミノ酸が付加し、かつ糖を含まないMK) であり、 $\alpha 1$ 因子のシグナル配列を使用した方が、ヒトMK自身のシグナル配列を使用した場合よりも約5~8倍程度の発現量が得られることが明らかである。

【0018】

発現株pPIC9K-4AhMK/GS115のファーメンター培養上清からMKタンパク質をSP-セファロースおよびヘパリンセファロースにより精製し、MALDI法 (matrix-assisted laser desorption ionization/ time-of-flight mass spectrometer) で質量分析すると、図8に示すように、予想発現物の他に、アミノ末端から、Tyr-Val-Glu-Phe-Lysの5アミノ酸が除かれたもの、Tyr-Val-Glu-Phe-Lys-Lys-Lysの7アミノ酸が除かれたもの、Tyr-Val-Glu-Phe-Lys-Lys-Lys-Asp-Lys-Val-Lys-Lysの12アミノ酸が除かれたものが観察される。また、発現物のアミノ末端分析

らは予想発現MKタンパク質のアミノ

ファーマンター培養におけるMKタン

を、精製してMALDI法で質量分析する

Kタンパク質の生物活性を、NIH3T3

ンパク質の2次構造に関する情報を

明により得られた真正MKタンパク質はその立体構造をよく保っていると考えられる。また、本発明によれば、PTNタンパク質についても、図14のHPLC溶出プロファイル、および図15の質量分析結果に示すように、真正PTNタンパク質が259 μ g/Lと高発現で得られており、真正PTNタンパク質の大量分泌発現系が提供される。

【0021】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

【0022】

【実施例1】MKタンパク発現ベクターの構築

3種類の分泌シグナル配列を含むヒトMKタンパク発現ベクターを構築した。発現ベクターの構築は、例えば文献(J.Sambrook, E.F.Fritsch, T.Manias: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989)により記載されたような標準的な方法に準じて行った。

(1) MKタンパク固有の分泌シグナル配列を含む発現ベクター

MKタンパク固有のシグナル配列を含む発現ベクターは、特開平9-95454号公報の実施例1に記載のMKタンパク発現ベクターpHLD4-hMKを使用した。

(2) PHO1の分泌シグナル配列を含む発現ベクターの構築

PHO1のシグナル配列(図1)を含む発現ベクターpHILS1 (PHILLIPS PETROLEUM Co.,) (図2)を使用した。該発現ベクターは、アルコール オキシダーゼのプロモーター、PHO1のシグナル配列および該配列中におけるマルチクローニング部位、選択マーカーとしてHIS遺伝子およびアンピシリン耐性遺伝子等を含んでいる。ヒトMKタンパク質をコードするcDNA(配列番号: 1)を鋳型とし、制限酵素EcoRI認識部位を含むセンスPCRプライマー(配列番号: 3)およびアンチセンスPCRプライマー(配列番号: 4)を用いてPCR反応を行い、成熟MK cDNA増幅した。MK cDNAは、制限酵素EcoRIにより完全消化し、ホスファターゼで脱リン酸された発現ベクターpHILS1のEcoRI部位に挿入し、MKタ

ンパク発現ベクター“pHILS1-3AhMK”を得た。該発現ベクターで大腸菌HB101を形質転換した。形質転換した大腸菌クローンをいくつか選び、これに含まれる発現ベクターを鋳型とし、適当なプライマーを使用してPCRを行い、挿入cDNAの方向が正しいことを確認した。さらに、該発現ベクターについて、MK cDNAおよび挿入部位付近の塩基配列を決定し、塩基配列に誤りのないことを確認した。該発現ベクターpHILS1は、正常にプロセスされたとしても3個の余分なアミノ酸が成熟MKタンパク質のアミノ末端に結合することになる。

(3) $\alpha 1$ 因子分泌シグナル配列を含む発現ベクターの構築 (その1)

サッカロミセス セレビスエの α フェロモン遺伝子(MF $\alpha 1$)の分泌因子シグナル配列(以下、「 $\alpha 1$ 因子分泌シグナル配列」という)(図3)を含む発現ベクターpPIC9K(図4)を使用した。該発現ベクターは、上記発現ベクターpHILS1に、さらにG418による多コピー選択用のカナマイシン耐性遺伝子を含んでいる。上記(2)の方法に準じて、MK cDNAを発現ベクターpPIC9Kに挿入し、MKタンパク発現ベクター“pPIC9K-4AhMK”を得た。該発現ベクターは、正常にプロセスされたとしても、4個の余分なアミノ酸が結合することになる。

(4) $\alpha 1$ 因子分泌シグナル配列を含む発現ベクターの構築 (その2)

$\alpha 1$ 因子分泌シグナルを含む発現ベクターpPIC9(図5)を使用した。pPIC9に挿入するMK cDNAは、センスPCRプライマー(配列番号: 5)およびアンチセンスPCRプライマー(配列番号: 4)を用いて(2)と同様にして作製した。

制限酵素EcoRIおよびXhoIにより完全消化されたMK cDNAは、同様に消化され、ホスファターゼで脱リン酸された発現ベクター pPIC9に挿入し、MKタンパク発現ベクター“pPIC9DP-hMK”を得た。

【0023】

[実施例2] MKタンパク質発現ベクターによるピキア酵母の形質転換

ピキア酵母GS115、およびSMD1168へのMKタンパク質発現ベクターの導入は、Invitrogenの電気穿孔法のプロトコル(例えば、pPICZA α , B, C, Version A, 160410, 25-0150)に準じて行った。SMD1168は、プロテアーゼ活性が低いpep4⁻株である。

実施例1で得られたMKタンパク発現ベクターpHILD4-hMK、pHILS1-3AhMK、pP

IC9K-4AhMK、あるいはpPIC9DP-hMKは、制限酵素SacIまたはBglIIで完全消化した。初期対数増殖期のGS115、あるいはSMD1168を蒸留水、および1Mソルビトールで洗浄後、1Mソルビトールに懸濁し、発現ベクターを加えた。Bio-RadのGenePulserを用い、1.5kV、25 μ F、200-400オームの条件で電気穿孔法を行った。形質転換体は、Hisの非要求性でまず選択し、必要であればさらにG418耐性による選択を行った。このようにして、発現ベクターpHILD4-hMK、pHILS1-3AhMK、pPIC9K-4AhMK、あるいはpPIC9DP-hMKで形質転換されたMKタンパク発現株pHILD4-hMK/GS115、pHILS1-3AhMK/GS115、pPIC9K-4AhMK/GS115、あるいはpPIC9DP-hMK/SMD1168を得た。

【0024】

【実施例3】 MKタンパク質発現株の試験管またはフラスコ培養

培地はファーマンター用完全合成培地を使用し、グリセリンを炭素源として、1日培養した。1度菌体を遠心して沈殿させ、1%メタノールを含んだ新しい培地に懸濁し、MKタンパクの発現を誘導した。1%メタノールは毎日添加し、その際に、pHを5または3に調製した。発現誘導は3日間行った。

(1) 分泌シグナルによる発現量の違い

発現株pHILD4-hMK/GS115、pHILS1-3AhMK/GS115、あるいはpPIC9K-4AhMK/GS115の試験管培養における培養上清中のMKタンパクの発現量を調べた。pHILS1-3AhMK/GS115の場合、MKタンパク質の発現量は極めて少なく、多いものでも0.1 μ g/L程度であった。発現株pHILD4-hMK/GS115の場合、発現量の多いものでは2~3 μ g/Lの分泌が認められた。これに対して、発現株pPIC9K-4AhMK/GS115の場合には、発現量の多いものでは10 μ g/Lに達した。すなわち、 α 1因子のシグナル配列を用いると、MKタンパク固有の分泌シグナル配列を用いた場合の3~5倍程度のMKタンパク質の発現量が得られることが明らかである。

(2) 発現時のpHによる発現物の違いについて

発現株pPIC9K-4AhMK/GS115を用いて、発現時のpHを3および5に調整した発現を行った。培養上清をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分析した。ゲルプレートは第一化学薬品(株)のマルチゲル10/20を使用した。発現3日目のMKタンパク質は、2本のバンドとして認められ、pH5では、分子量の

小さい下のバンドが主となるが、pH3では分子量の大きい上のバンドが主である。これは、pH3では、pH5よりもMKタンパク質の分解が少ないことを示唆している。

(3) 宿主の種類による発現物の違いについて

発現株pPIC9K-4AhMK/GS115、およびpPIC9DP-hMK/SMD1168におけるMKタンパクの発現を調べた。3日間発現後の培養上清のSDS-PAGEでは、pPIC9K-4AhMK/GS115の場合には、明らかにMKタンパクが2本に見えるが、pPIC9DP-hMK/SMD1168の場合には、1本であった。すなわち、プロテアーゼ活性の低い細胞株SMD1168を宿主とした場合には、MKタンパク質の分解が抑えられていることを示唆している。

【0025】

〔実施例4〕 MK発現株のファーメンター培養

発現株pHILD4-hMK/GS115およびpPIC9K-4AhMK/GS115のファーメンター培養を、発現時の培養温度を20℃にした以外は、基本的にはJ.J.Clareら (BIO/TECHNOLOGY, Vol.9, 455-460, 1991) の方法にしたがって行った。発現4日目の培養上清中のMKタンパク質をELISA法 (特開平10-160735記載の方法) で測定した。pHILD4-hMK/GS115の場合、MKタンパク発現量が30~50mg/L ($1.8A_{280}=1\text{mg/ml}$ として計算) であるのに対して、pPIC9K-4AhMK/GS115の場合は約200mg/Lであり、さらに、培地にEDTAを加えると約240mg/Lと増加した (図6)。一方、同じサンプルについて、MKタンパクの発現量を、Hitrap-Heparin (ファルマシア社製, 1ml) カラムを用いたFPLC分析 (0-2M NaCl, 50mM pH7.5 Tris-HCl緩衝液、流速1 ml/min) にて、280nmの吸光度により測定した結果 (標準物質はペプチド研究所製化学合成の成熟MKタンパク質) では、pHILD4-hMK/GS115の場合約50mg/Lであるのに対して、pPIC9K-4AhMK/GS115の場合約580mg/Lを示し、さらにEDTAを加えた場合は約640mg/Lを示した (この内約1/3がN末端に4個のアミノ酸が付加し、かつ糖を含まないMK) (図7)。すなわち、ファーメンター培養の場合も、試験管培養の場合と同様に、 $\alpha 1$ 因子のシグナル配列を用いると、MKタンパク固有の分泌シグナル配列を用いた場合よりも、MKタンパクの発現量が5~8倍程度増加した。また、培養上清中のSDS-PAGEおよびウエスタンブロットによる分析結果から

、培養上清中の主たるタンパク質は、分泌発現したヒトMKであることが明らかであった。

【0026】

〔実施例5〕 精製MKタンパク質の解析（その1）

pPIC9K-4AhMK/ GS115のファーマンター培養上清から、SP-セファロースおよびヘパリンセファロースを用いてMKタンパクを精製した。

培養上清10mlを取り、等量の蒸留水を加えて希釈した。pHをアンモニアで5に調製し、60mM酢酸緩衝液pH5.2で平衡化した約1mlのファルマシア社のストリームラインSPカラムにアプライし、吸着後、0.5M NaClを加えた緩衝液で洗い、その後2M NaClを含んだ緩衝液でMKタンパクを溶出した。溶出物を50mM Tris-HCl (pH7.5) の緩衝液に対して透析した。透析物を上記透析に使用した緩衝液で平衡化したファルマシア社のストリームラインヘパリン約0.5mlのカラムにアプライし、0.5M NaClを含んだ上記緩衝液でカラムを洗浄後、2M NaClを含んだ上記緩衝液でMKタンパクを溶出した。溶出物を蒸留水に対して透析して精製MKタンパク質を得た。

精製MKタンパクの質量分析は、MALDI法 (matrix-assisted laser desorption ionization/ time-of-flight mass spectrometer) により行った。使用した分析器は、PerSeptive BiosystemsのVOYAGER ELITEである。マトリックスとしては、Sinapinic acid (10mg/ml アセトニトリル/水/TFA=33/67/0.1) を用いた。乾燥サンプルを30μlの水に溶解し、マトリックス溶液を9倍量加えた溶液を1μlサンプルプレートにアプライし使用した。キャリブレーションは、Ubiquitin(+1):8565.89(average)とMyoglobin(+1):16952.56(average)を標準タンパク質として行った。

アミノ末端アミノ酸配列の分析は、エドマン法により行った。使用したプロテインシーケンサーは、島津製作所のPPSQ21である。

精製MKの質量分析では、予想MKタンパク質（成熟MKタンパク質のN末端にTyr-Val-Glu-Pheが付加したもの）の他に、該タンパクのN末端から、Tyr-Val-Glu-Phe-Lysの5アミノ酸が除かれたもの、Tyr-Val-Glu-Phe-Lys-Lys-Lysの7アミノ酸が除かれたもの、Tyr-Val-Glu-Phe-Lys-Lys-Lys-Asp-Lys-Val-Lys-Lys

の12アミノ酸が除かれたものが観察された(図8)。また、発現MKタンパクのN末端分析の結果、Tyr、Lys、Aspが検出され、これらは予想発現物MKタンパク質、アミノ末端から上記5アミノ酸が除かれたもの、および7アミノ酸が除かれたもののアミノ末端のアミノ酸と一致する。そして、糖の結合したMKの明らかなシグナルは観察されない。これらの結果から、発現MKタンパク質は、糖の結合が少ない真正MKタンパク質であることが明らかである。

すなわち、 $\alpha 1$ 因子のシグナル配列を使用すると、MK固有のシグナル配列を使用する場合と比較して、MKタンパク質の発現量が著明に増大することが明らかである。

【0027】

[実施例6] 精製MKタンパク質の解析(その2)

実施例2で得られた発現株pPIC9DP-hMK/SMD1168をファーメンター培養した。基本的には実施例4に記載の方法にしたがったが、グリセリンによる細胞増殖を $A_{600}=100$ 程度までにし、その後メタノール添加を開始し、細胞増殖と発現誘導を同時に行った。発現時の温度は20℃、pHは3に設定した。発現誘導は9日間行った。FPLCによってMKタンパクの発現量を測定した結果、培養8日目に最大360mg/Lであった(図9)。7日目の培養上清10mlからMKタンパク質を、実施例5と同様にして、SP-セファロース、およびヘパリンセファロースを使用して精製した。また、別に、Hitrap-Heparin(ファルマシア社製,1mL)カラムを用いたFPLC[50mM Tris-HCl (pH7.5) 緩衝液中、0-2M NaCl濃度勾配による溶出]による精製も行った。

発現MKタンパクを、標準物質である化学合成の成熟MKタンパク質(ペプチド研究所)の、還元SDS-PAGE、非還元SDS-PAGE、およびNative-PAGE(native-PAGEは、Davisの方法に従って行ったが、目的タンパク質の等電点が高いため、泳動槽の電極の結合を逆にした)を行って比較したが、分子量などの違いは認められなかった。アミノ末端のアミノ酸配列は、表1に示すように、成熟MKタンパクのアミノ末端のアミノ酸配列に一致した。

【0028】

【表 1】

分析サイクル	アミノ酸の種類	アミノ酸量(pmol)
1	Lys	114
2	Lys	119
3	Lys	132
4	Asp	109
5	Lys	125
6	Val	137
7	Lys	123
8	Lys	121
9	Gly	94
10	Gly	94

【0029】

また、試料を100 μ Lの純水に溶解し、この内の50 μ Lをガラス試験管に採取し、50 μ Lの濃塩酸を添加し、真空封管下、110℃で22時間加水分解反応を行った。試料を乾固し、再び、75 μ Lの純水に溶解し、その内50 μ Lを日立アミノ酸分析計 L8500 を用いたアミノ酸分析法によりMKのアミノ酸組成を分析した。結果を表 2 に示す。

【0030】

【表 2】

Amino acid	Expected	hMK(Std) (ペプチド研)	rhMK (pPIC9DPhMK/SMD1168)
Asx	8	7.66	7.70
Thr	10	9.51	9.59
Ser	3	2.81	2.78
Glx	11	11.22	11.37
Gly	16	16.00	16.00
Ala	10	9.96	10.03
Val	5	4.88	4.89
Cys	10	n. d.	n. d.
Met	0	0.00	0.00
Ile	2	1.85	1.93
Leu	1	0.98	1.01
Tyr	2	1.93	1.73
Phe	3	2.93	2.97
Lys	23	22.81	22.62
His	0	0.00	0.00
Arg	7	6.73	6.80
Trp	4	n. d.	n. d.
Pro	6	6.11	5.89

【0031】

塩酸の加水分解を行っているために測定できないTrpや正確な数値が得にくいCysを除いて、理論値、および標準物質である化学合成の成熟MKタンパク質（ペプチド研究所）の値と比較して良い一致を示し、純度よくMKが得られたことを示している。

質量分析の結果は、予想値の分子量とほぼ同じ13241.2(+1の値、理論値+1は13241.3)であり（図10）、宿主をGS115からSMD1168に変更するととも培養条件を変えると、pPIC9K-4AhMK/GS115の場合と比較して、分解物の量はごく僅かとなった。そして、糖の結合したMKによるシグナルも認められなかった。比較のために、MK自身のシグナル配列を含む発現株（pHIL4-hMK/GS115）を培養し、発現されたMKを精製して質量分析した結果を図11に示す。真正MKのピークは最も高い（測定値13241.6）が、糖が一個から18個結合していると考えられるMKのピークが観察される。真正MKより質量数の少ないものは部分的に分解され

たMKと考えられる。真正MKはある割合でしか得られず、また、糖の結合のみが異なる分子種が多数含まれるため、真正MKの精製も困難である。以上のことから、ここで得られたMKタンパク質は、糖の結合がない真正な成熟MKタンパク質が大部分をしめる。また、発現量も今まで使用していた株に比べると格段に多い。したがって、この発現株pPIC9DP-hMK/SMD1168をMKタンパク質の分泌生産に使用すれば、真正MKタンパク質を大量分泌発現させることが可能である。

また、試料を100 μ Lの純水に溶解し、この内の50 μ Lをガラス試験管に採取し、50 μ Lの濃塩酸を添加し、真空封管下、110℃で22時間加水分解反応を行った。試料を乾固し、再び、75 μ Lの純水に溶解し、その内50 μ Lを日立アミノ酸分析計L8500を用いたアミノ酸分析法によりMKのアミノ酸組成を分析した。結果を表2に示す。

また、ここで得られた真正MKタンパク質の2次構造に関する情報を得るためにCDスペクトルを測定した結果を図12に示す。

【0032】

〔実施例7〕 生物活性測定

(1) NIH3T3線維芽細胞の増殖活性

Swissマウス胎児由来の株化線維芽細胞NIH3T3に対する細胞増殖促進活性を検討した。96-Well細胞培養プレートにウェルあたり、2000個のNIH3T3細胞を播種し、10%仔ウシ血清(FCS)を添加したDulbecco's modified Eagle medium (DMEM)で24時間培養した。この培地に真正MKを0~5000ng/ μ L (BSAを標準タンパク質としたBCA法に基づくタンパク質濃度)添加したDMEM/Ham's F-12 1:1混合培地+ITS (10ng/L human insulin, 10ng/L human transferrin, 10 μ g/L selenous acid)に全量交換し、さらに2日間培養した。その後、培地にWST-1試薬を添加し、4時間後の各ウェルの吸光度をプレートリーダーにより計測し、生細胞数を測定した。その結果、生細胞数は用量依存的に増加することが明らかとなった(図13)。

【0033】

〔実施例8〕PTNタンパク発現ベクターの構築

実施例1に準じて、 α 1因子分泌シグナル配列を含むヒトPTNタンパク発現

ベクター “pPIC9-hPTN” を構築した。ヒト P T N タンパク質をコードする cDNA は、P T N cDNA (配列番号: 6) を鋳型とし、制限酵素 EcoRI 認識部位を含むセンス P C R プライマー (配列番号: 8)、およびアンチセンス P C R プライマー (配列番号: 9) を用いて P C R 反応を行い、成熟 P T N cDNA 増幅し、大腸菌 XL1-Blue MRF' を形質転換して得た。

【0034】

[実施例 9] P T N タンパク質発現ベクターによるピキア酵母の形質転換

実施例 2 に準じて、pPIC9-hPTN を、ピキア酵母 GS115 に導入し、P T N タンパク質発現株 pPIC9-hPTN/GS115 を得た。

【0035】

[実施例 10] P T N タンパク質の発現

pPIC9-hPTN/ GS115 を、実施例 4 の方法に準じて、ファーマンタ培養し、その培養上清 50 μ l を HPLC カラム (PolySULFOETHYL A ; Poly LC 社) で分離した。溶出は、0.7 M Na_2SO_4 -35 mM MPB (リン酸緩衝液 pH2.7) で行った。結果を図 14 に示す。

保持時間 30 分までは核酸などの低分子物質、140~162 分は、糖付加 P T N と考えられ、179 分のピークが真正 P T N タンパク質とみなされる。ピーク面積より、真正 P T N タンパクの理論発現量は 259 mg/mL である ($A_{280}=1\text{mg/mL}$ として求めた。P T N の理論吸光係数は $1.5A_{280}=1\text{mg/mL}$ として計算)。

【0036】

[実施例 11] 精製 P T N タンパク質の解析

精製 P T N のアミノ末端のアミノ酸配列は表 3 に示すように真正 P T N タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列に一致した。

【0037】

【表 3】

分析サイクル	アミノ酸の種類	アミノ酸量 (pmol)
1	Gly	95
2	Lys	111
3	Lys	111
4	Glu	96
5	Lys	112
6	Pro	75
7	Glu	58
8	Lys	74
9	Lys	86
10	Val	67

【0038】

MALDI法による質量分析では、予想値15302.8とほぼ同じ15305.3を主たるピークとした（図15）。第2ピークは修飾されたPTNを示すものと考えられる。予想値よりも質量数の少ないものは部分的に分解されたPTNであろう。以上のことから、ここで得られたPTNタンパク質は、真正な成熟PTNタンパク質を主たるタンパク質として含むものと考えられる。したがって、この発現株pPIC9-hPTN/GS115はPTNタンパク質の分泌生産への使用に適していると考えられる。

【0039】

【発明の効果】

本発明により、真正MKファミリータンパク質の大量分泌発現系が提供される。

【0040】

【図面の簡単な説明】

【図1】 ピキア酵母酸性ホスファターゼ分泌シグナル部分の塩基配列を示す図である。Vは、シグナルペプチドの切断部位を示す。

【図2】 MKタンパク質発現ベクターに使用するpPHIL-S1の構造を示す図である。該ベクターは、ピキア酵母アルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーター（5' AOX1）、ピキア酵母酸性ホスファターゼ（PH01）のシグナル配列（S）、AOX1遺伝子の転写終結のためのDNA配列（3' AOX1-TT）、および5' AOX1と共にピキア酵母染色体DNAへの部位特異的挿入に関与する3' AOX1を含み、シグナル配列直後に

マルチクローニング部位を含む。大腸菌での複製開始点として、pBR322由来ColE1およびバクテリオファージf1を含み、選択マーカとして、アンピシリン耐性遺伝子 (Ampicillin)、およびピキア酵母ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (HIS4) を含む。

【図3】 サッカロミセス・セレビスエ由来の $\alpha 1$ 因子分泌シグナル部分の塩基配列を示す図である。(1)は、プレ配列の切断部位を、(2)は、プレプロ配列の切断部位を、(3)は、ジペプチジルアミノペプチダーゼによる切断部位を示す。

【図4】 MKタンパク質発現ベクターに使用するpPIC9Kの構造を示す図である。該ベクターは、ピキア酵母アルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーター (5' AOX1)、サッカロミセス・セレビスエ由来の $\alpha 1$ 因子のシグナル配列 (S)、AOX1遺伝子の転写終結のためのDNA配列 (3' AOX1-TT)、および5' AOX1と共にピキア酵母染色体DNAへの部位特異的挿入に関与する3' AOX1を含み、シグナル配列直後にマルチクローニング部位を含む。大腸菌での複製開始点として、pBR322由来ColE1を含み、選択マーカとして、アンピシリン耐性遺伝子 (Ampicillin)、ピキア酵母ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (HIS4)、およびカナマイシン耐性遺伝子 (Kanamycin) を含む。

【図5】 MKタンパク質発現ベクターに使用するpPIC9の構造を示す図である。該ベクターは、ピキア酵母アルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーター (5' AOX1)、サッカロミセス・セレビスエ由来の $\alpha 1$ 因子のシグナル配列 (S)、AOX1遺伝子の転写終結のためのDNA配列 (3' AOX1-TT)、および5' AOX1と共にピキア酵母染色体DNAへの部位特異的挿入に関与する3' AOX1を含み、シグナル配列直後にマルチクローニング部位を含む。大腸菌での複製開始点として、pBR322由来ColE1を含み、選択マーカとして、アンピシリン耐性遺伝子 (Ampicillin)、およびピキア酵母ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (HIS4) を含む。

【図6】 MKタンパク質発現株pPIC9K-4AhMK/GS115 (サッカロミセス・セレビスエ由来の $\alpha 1$ 因子のシグナル配列を含む) の5mM EDTA存在下、EDTA非存在下におけるファーマンター培養、およびpHIL4-hMK/GS115 (MKタンパク質固有分泌のシグナル配列を含む) のファーマンター培養、における培養上清中のMKタン

パク質の発現量を、ELISA法により測定した結果を示す図である。

【図 7】 同じく、図 6 の培養上清中の MK タンパク質の発現量を、FPLC で測定した結果を示す図である。

【図 8】 MK タンパク質発現株 pPIC9K-4AhMK/GS115 (サッカロミセス・セレビシエ由来の $\alpha 1$ 因子のシグナル配列を含む) の培養上清中から精製した MK タンパク質の MALDI 質量分析結果を示す図である。

【図 9】 MK タンパク質発現株 pPIC9DP-hMK/SMD1168 (サッカロミセス・セレビシエ由来の $\alpha 1$ 因子のシグナル配列を含む) のファーメンター培養における培養上清中の MK タンパク質の発現量を FPLC にて測定した結果を示すグラフである。

【図 10】 同じく、真正 MK タンパク質発現株 pPIC9DP-hMK/SMD1168 (サッカロミセス・セレビシエ由来の $\alpha 1$ 因子のシグナル配列を含む) の培養上清中から精製した MK タンパク質の質量分析結果を示す図である。

【図 11】 同じく、MK タンパク質発現株 pHILD4-hMK/GS115 (MK タンパク質自身のシグナル配列を含む) の培養上清中から精製した MK タンパク質の MALDI 質量分析結果を示す図である。

【図 12】 発現株 pPICDP-hMK/SMD1168 をファーメンター培養で得られた精製 MK タンパクの CD スペクトルを示す図である。

【図 13】 真正 MK タンパク質による NIH3T3 細胞の増殖活性を示す図である。

【図 14】 pPIC9-hPTN/ GS115 のファーメンタ培養上清の HPLC カラム (PolySULFOETHYL A ; Poly LC 社) による溶出プロファイルを示す図である。

【図 15】 培養上清中から精製した PTN タンパク質の MALDI 質量分析結果を示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Milk Prod co ltd

<120> Production of Midkine family proteins in methylotrophic yeast cells

<130> P99003

<141> 1999-03-26

<150> JP 10-236621

<151> 1998-08-10

<160> 9

<210> 1

<211> 562

<212> DNA

<213> Human

<400> 1

```

atgcagcacc gaggtttcct cctcctcacc ctcctcgccc tgctggcgct cacctccgcg   60
gtcgccaaaa agaaagataa ggtgaagaag ggcgggcccg ggagcgagtg cgctgagtgg  120
gcctggggggc cctgcacccc cagcagcaag gattgcggcg tgggtttccg cgagggcacc  180
tgcggggccc agaccagcg catccggcgc agggcgcct gcaactggaa gaaggagttt  240
ggagccgact gcaagtacaa gtttgagaac tggggtgcgt gtgatggggg cacaggcacc  300
aaagtccgcc aaggcacct gaagaaggcg cgctacaatg ctcagtcca ggagaccatc  360
cgcgtcacca agccctgcac cccaagacc aaagcaaagg ccaaagccaa gaaagggaag  420
ggaaaggact agacgccaag cctggatgcc aaggagcccc tgggtgcaca tggggcctgg  480
cccacgcct cctctccca ggcccagat gtgaccacc agtgccttct gtctgctcgt  540
tagctttaat caatcatgcc cc                                           562

```

<210> 2

<211> 143

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

```

Met Gln His Arg Gly Phe Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala Leu Leu Ala
  1              5              10             15
Leu Thr Ser Ala Val Ala Lys Lys Lys Asp Lys Val Lys Lys Gly Gly
      20              25             30
Pro Gly Ser Glu Cys Ala Glu Trp Ala Trp Gly Pro Cys Thr Pro Ser
      35              40             45
Ser Lys Asp Cys Gly Val Gly Phe Arg Glu Gly Thr Cys Gly Ala Gln
      50              55             60
Thr Gln Arg Ile Arg Cys Arg Val Pro Cys Asn Trp Lys Lys Glu Phe
      65              70             75             80

```

出証特平 1 1 - 3 0 5 9 9 1 7

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 5

gcgcccctcg agaaaagaga ggctgaagct aaaaagaaag ataaggtaga gaagggcggc 60

<210> 6

<211> 507

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

atgcaggctc aacagtacca gcagcagcgt cgaaaatttg cagctgcctt cttggcattc 60

attttcatac tggcagctgt ggatactgct gaagcaggga agaaagagaa accagaaaaa 120

aaagtgaaga agtctgactg tggagaatgg cagtggagtg tgtgtgtgcc caccagtgga 180

gactgtgggc tgggcacacg ggagggcact cggactggag ctgagtgcaa gcaaaccatg 240

aagaccaga gatgtaagat cccctgcaac tggaagaagc aatttggcgc ggagtgc aaa 300

taccagttcc aggcctgggg agaatgtgac ctgaacacag ccctgaagac cagaactgga 360

agtctgaagc gagccctgca caatgccgaa tgccagaaga ctgtcaccat ctccaagccc 420

tgtggcaaac tgaccaagcc caaacctcaa gcagaatcta agaagaagaa aaaggaaggc 480

aagaaacagg agaagatgct ggattaa 507

<210> 7

<211> 168

<212> PRT

<213> Human

<400> 7

Met Gln Ala Gln Gln Tyr Gln Gln Gln Arg Arg Lys Phe Ala Ala Ala

1 5 10 15

Phe Leu Ala Phe Ile Phe Ile Leu Ala Ala Val Asp Thr Ala Glu Ala

20 25 30

Gly Lys Lys Glu Lys Pro Glu Lys Lys Val Lys Lys Ser Asp Cys Gly

35 40 45

Glu Trp Gln Trp Ser Val Cys Val Pro Thr Ser Gly Asp Cys Gly Leu

50 55 60

Gly Thr Arg Glu Gly Thr Arg Thr Gly Ala Glu Cys Lys Gln Thr Met

65 70 75 80

Lys Thr Gln Arg Cys Lys Ile Pro Cys Asn Trp Lys Lys Gln Phe Gly
85 90 95

Ala Glu Cys Lys Tyr Gln Phe Gln Ala Trp Gly Glu Cys Asp Leu Asn
100 105 110

Thr Ala Leu Lys Thr Arg Thr Gly Ser Leu Lys Arg Ala Leu His Asn
115 120 125

Ala Glu Cys Gln Lys Thr Val Thr Ile Ser Lys Pro Cys Gly Lys Leu
130 135 140

Thr Lys Pro Lys Pro Gln Ala Glu Ser Lys Lys Lys Lys Lys Glu Gly
145 150 155 160

Lys Lys Gln Glu Lys Met Leu Asp
165

<210> 8

<211> 48

<212> DNA

<213> Human

<400> 8

gcgcccctcg agaaaagagg gaagaaagag aaaccagaaa aaaaagtg

48

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

gcgcccgaat tcttaatcca gcattctctc ctgtttcttg cc

42

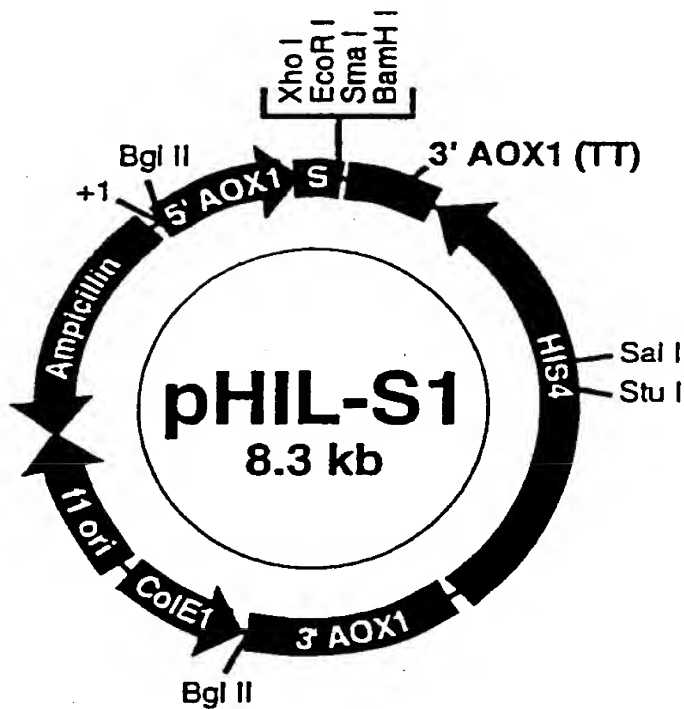
【書類名】 図面

【図 1】

```

<----- 5'AOX1-----><-PHO1 signal sequence-----
.....TTATTCGAAACG/ATG TTC TCT CCA ATT TTG TCC TTG GAA ATT ATT TTA GCT
TTG GCT ACT TTG CAA TCT GTC TTC GCTVCGA GAA TTC CCC GGG ATC CTT AGA CAT
--PHO1 signal sequence----->v<--Multi cloning site-----><-3'AOX1-
    
```

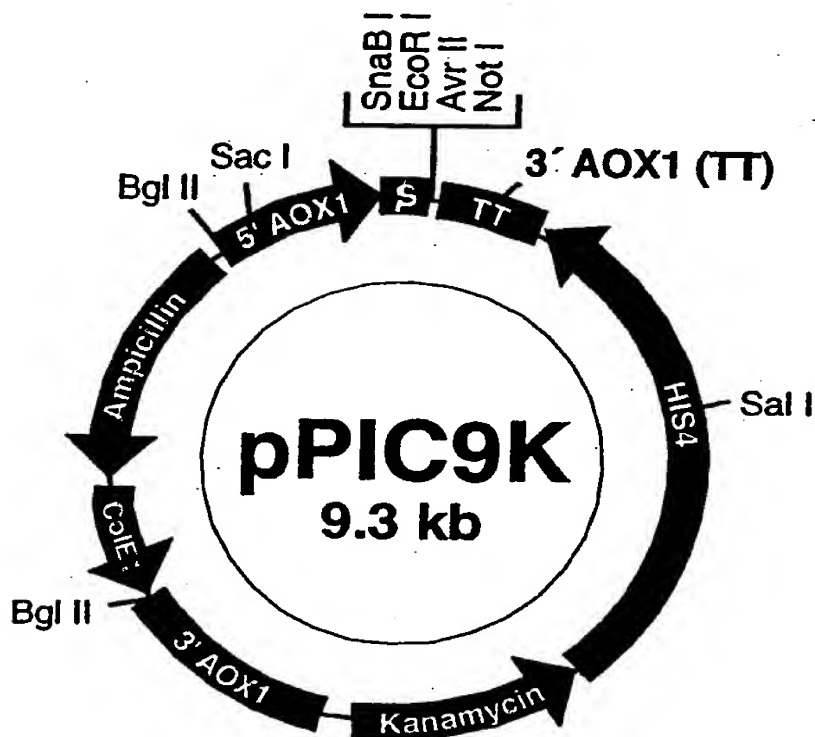
【図 2】



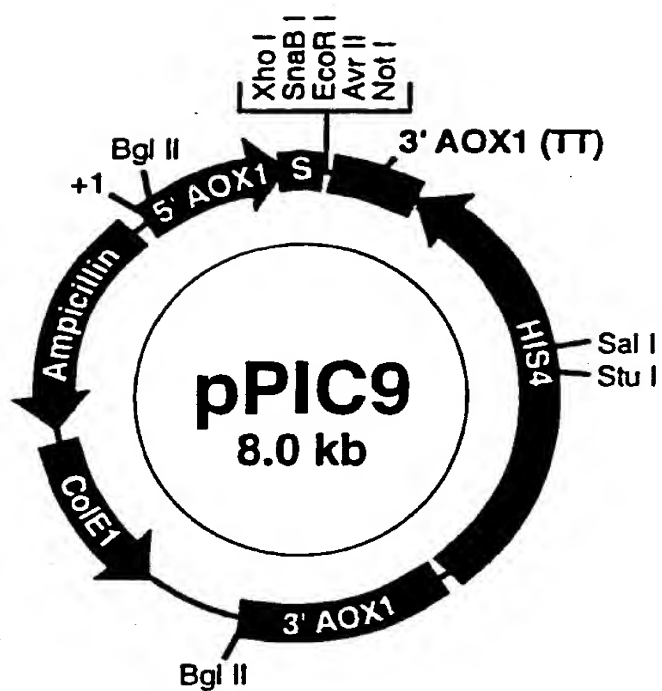
【図 3】

.....5'AOX1...TTCGAAGGATCCAAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA GTT
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val
(1)
TTA TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA
Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Arg Ile Thr Thr Glu Asp Glu
ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC
Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn
(2)
Xho I
ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA AGA GAG
Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Glu Lys Arg Glu
(3) Hind III
Sna BI Eco RI Avr II Not I
GCT GAA GCT TAC GTA GAA TTC CCT AGG GCG GCC GCG ...
Ala Glu Ala Tyr Val Glu Phe Pro Arg Ala Ala Ala

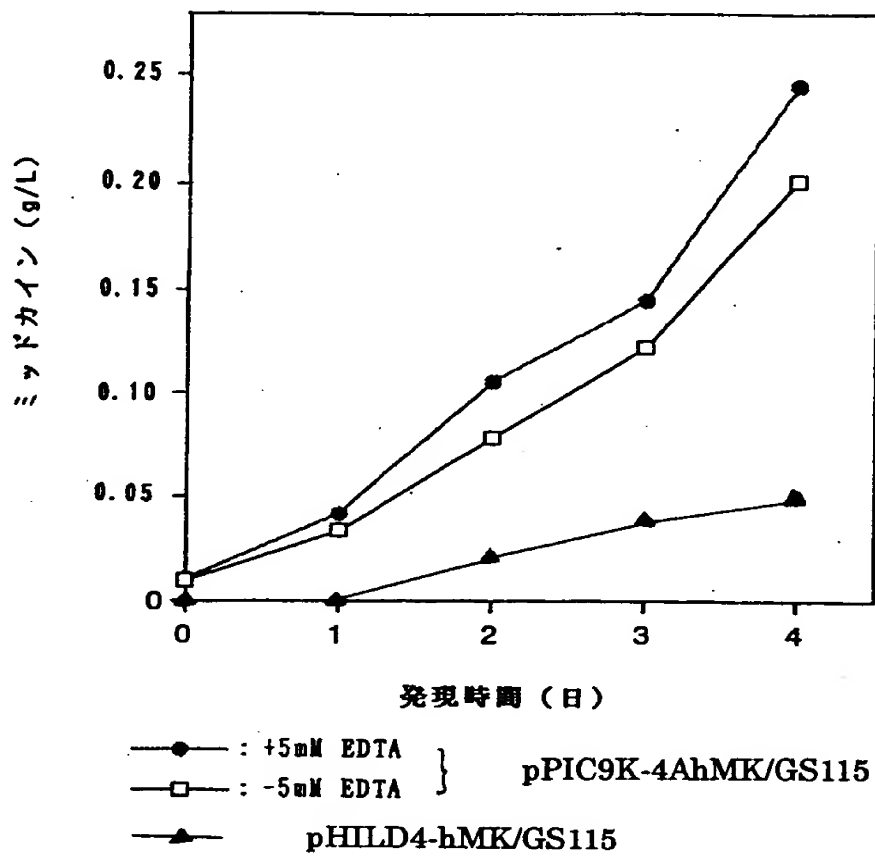
【図 4】



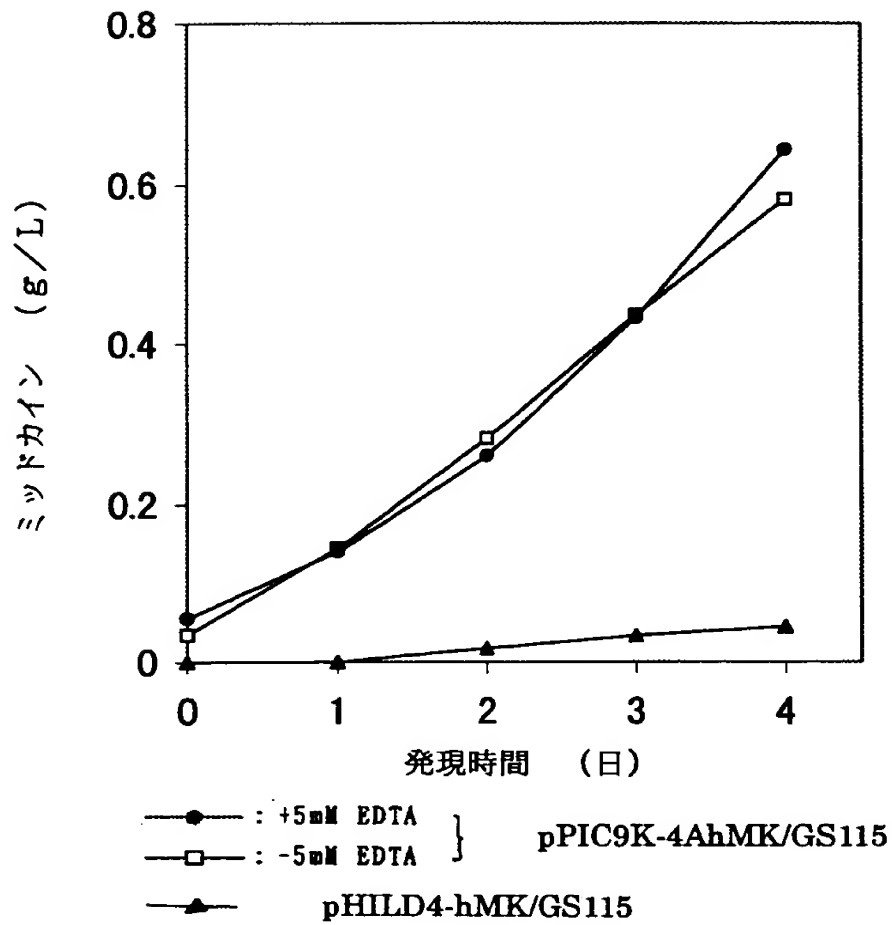
【図 5】



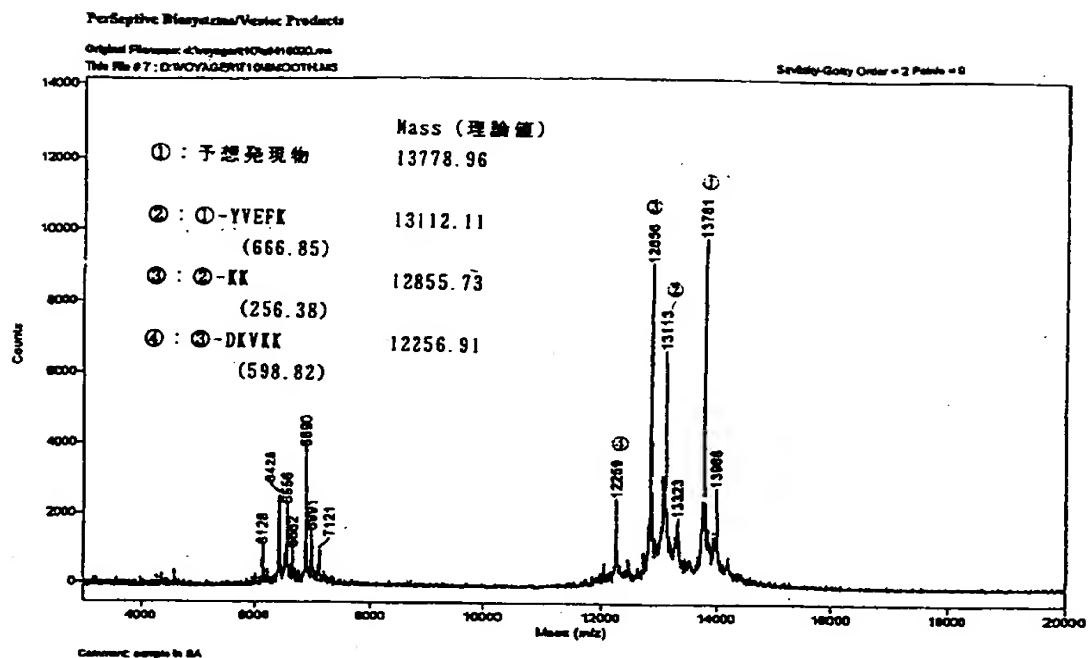
【図 6】



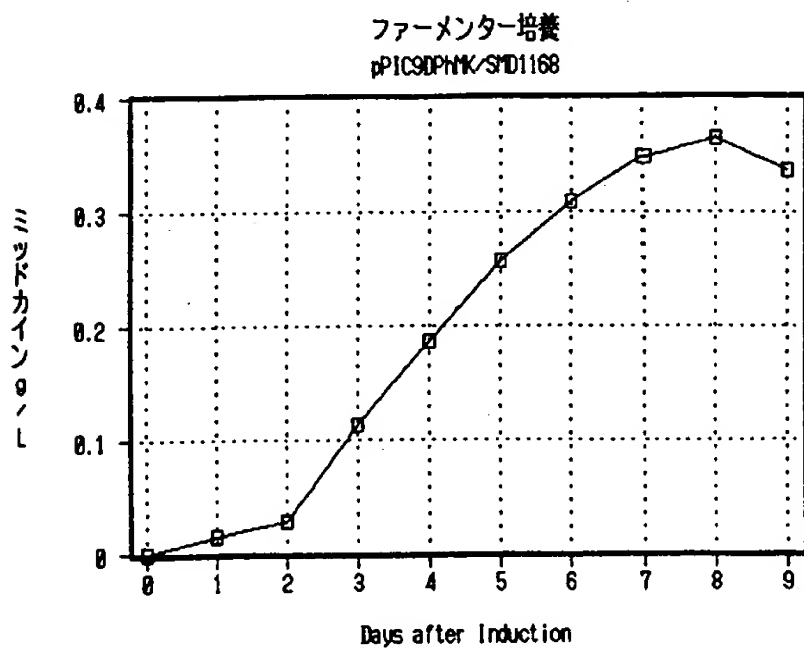
【図 7】



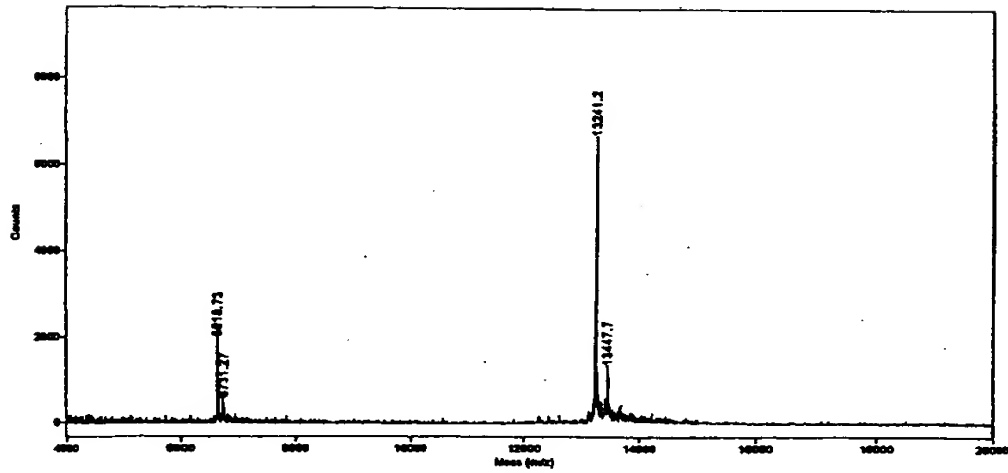
【図 8】



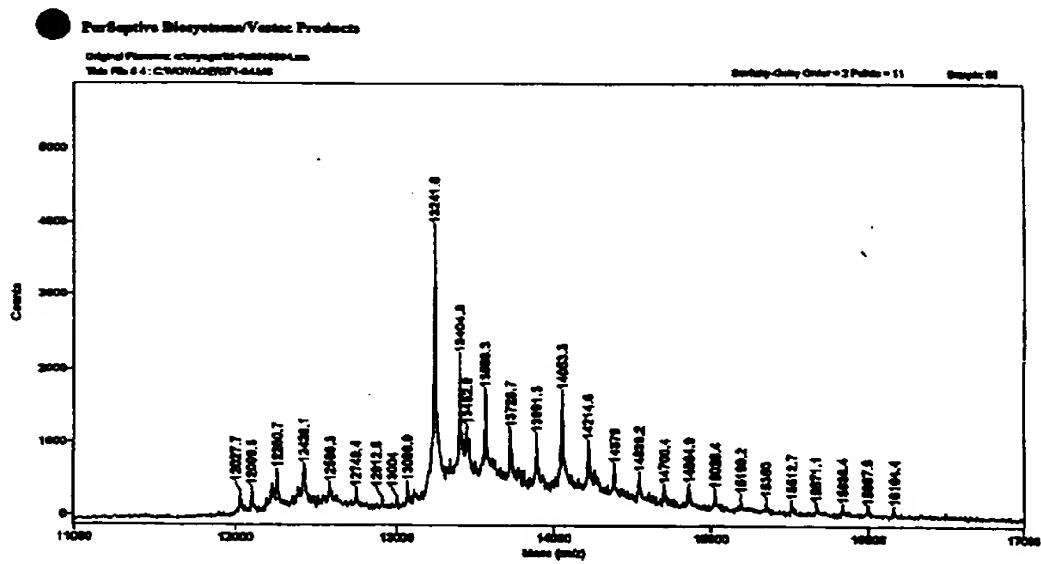
【図 9】



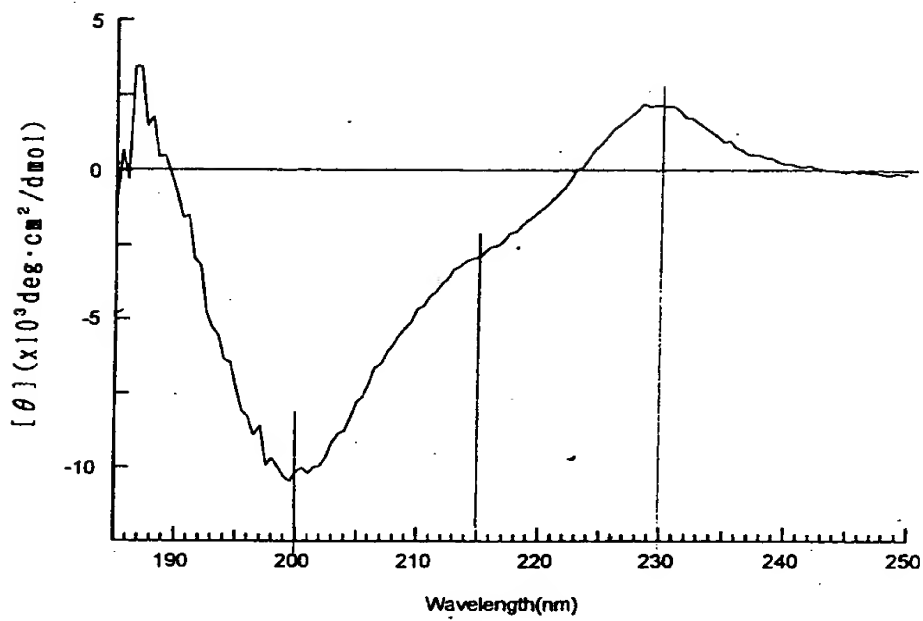
【図 10】



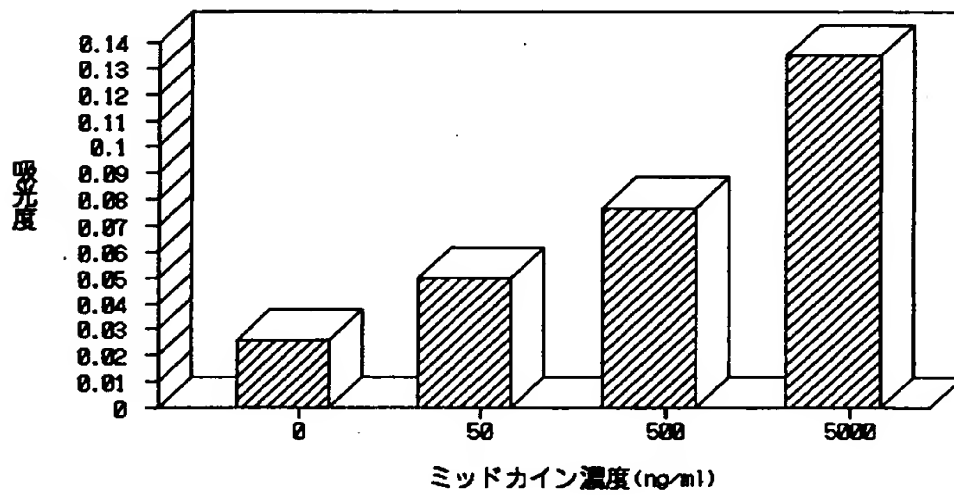
【図 11】



【図 1 2】



【図 1 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明は、メチロトロフィック酵母を宿主とする、真正MKファミリータンパク質の大量分泌発現系を提供することを課題とする。

【解決手段】

ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 由来のメタノール誘導性のアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1) プロモーターおよび転写終結配列の支配下に、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来の $\alpha 1$ 因子のシグナル配列を連結したMKファミリータンパク質遺伝子を含む発現ベクターにより形質転換されたピキア酵母を培養して、培養上清中に真正MKファミリータンパク質を大量に分泌発現させる。

【選択図】 図9

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 P99010

【提出日】 平成11年 4月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

 【出願番号】 平成11年特許願第 84583号

【補正をする者】

 【識別番号】 000006138

 【氏名又は名称】 明治乳業株式会社

 【代表者】 中山 悠

【発送番号】 011875

【手続補正 1】

 【補正対象書類名】 特許願

 【補正対象項目名】 特許出願人

 【補正方法】 変更

 【補正の内容】

 【特許出願人】

 【識別番号】 000006138

 【住所又は居所】 東京都中央区京橋 2 丁目 3 番 6 号

 【氏名又は名称】 明治乳業株式会社

 【代表者】 中山 悠

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006138]

1. 変更年月日 1990年 8月14日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都中央区京橋2丁目3番6号
氏 名 明治乳業株式会社

